

肺炎支原体黏附蛋白致病机制的探讨

侯婉莹 朴红梅 (通讯作者)

(延边大学附属医院 吉林延吉 133000)

【摘要】肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 是一种无细胞壁、可自我复制的非典型呼吸道病原体, 可在所有年龄段的儿童和成人中引起社区获得性肺炎 (CAP)。近年来, 肺炎支原体 (MP) 感染的发病率明显增加, 成为社区获得性肺炎的主要病因之一, 除严重的呼吸道症状外, 在皮肤、脑、肾、肌肉骨骼、消化系统甚至血液系统均有临床肺外表现。粘附是肺炎支原体致病性的首要因素和先决条件, 本文通过对黏附蛋白的结构、功能及致病机制进行综述, 旨在为有效预防和治疗肺炎支原体感染提供一定的指导

【关键词】肺炎支原体; 黏附蛋白

Exploration of the pathogenic mechanism of *M. pneumoniae* focal adhesion protein

Hou Wanying Pu Hongmei (corresponding author)

The Affiliated Hospital of Yanbian University, Jilin Yanji 133000

[Abstract] *Mycoplasma pneumoniae* (*Mycoplasma pneumoniae*) is a cell wall-free, self-reproducing atypical respiratory pathogen that causes community-acquired pneumonia (CAP) in children and adults of all ages. In recent years, the incidence of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) infection has increased significantly, becoming one of the main causes of community-acquired pneumonia. In addition to severe respiratory symptoms, there are clinical extrapulmonary manifestations in the skin, brain, kidney, musculoskeletal, digestive system and even blood system. Adhesion is the primary factor and prerequisite for *M. pneumoniae* pathogenicity, and this paper reviews the structure, function and pathogenic mechanisms of focal adhesion proteins, aiming to provide some guidance for the effective prevention and treatment of *M. pneumoniae* infection

[Key words] *Mycoplasma pneumoniae*; focal adhesion protein

肺炎支原体是一种无细胞壁、可自我复制、小基因组的非典型呼吸道病原体, 可导致急性上呼吸道和下呼吸道感染和肺外综合征, 是引起社区获得性肺炎的主要病原体之一^[1]。粘附是肺炎支原体致病性的首要因素和先决条件, 这种能力依赖于一种特殊的极化末端附着细胞器-黏附细胞器, 该细胞器具有粘附宿主细胞(细胞粘附)、滑行运动和细胞分裂的功能。黏附细胞器是由一些 nap 样表面结构和内部核心组成的膜突起, 它通过内部网状细胞骨架系统与表面粘附蛋白的相互作用实现复杂的多因素粘附过程。nap 样表面结构主要由黏附蛋白 P1、P30、P40 和 P90 组成。内部核心结构可分为三个部分, 包括终端按钮 (HMW2、HMW3、P65)、配对板 (HMW1、HMW2、CpsG、HMW3) 和碗(轮)复合体 (Lon、P24、TopJ、P200、P41、MPN387、HMW2)^[2]。MP 凭借其细胞粘附能力, 联合滑行运动, 使细胞能够从支气管纤毛尖端转移到宿主细胞表面^[3], 诱导纤毛静止, 保护肺炎支原体免受宿主纤毛粘液清除机制的清除, 有利于其在呼吸道的定植。

1.P1 蛋白

P1 蛋白是肺炎支原体的主要粘附蛋白之一, 含 4884bp, GC 含量为 53.5%, 相对分子量为 170 kda, 由 1627 个氨基酸残基组成^[4], 主要集中在黏附细胞器的顶端, 含有多个抗原决定簇, 具有高脯氨酸含量, 其 P1 蛋白的 c 端在粘附一系列宿主分子 (包括细胞骨架蛋白) 方面发挥重要作用^[5]。当肺炎支原体接触靶细胞时, 分散在细胞膜上的 P1 前体蛋白迅速转运到末端细胞器, 氨基末端的先导肽被水解为成熟的 P1 蛋白, 与宿主受体结合^[6], 黏附并隐藏在细胞间隙内, 逃避纤毛运动的清除作用和巨噬细胞的吞噬, 并释放 CARDS 毒素 (社区获得性呼吸窘迫综合征毒素)、过氧化氢和超氧自由基, 损伤宿主细胞。P1 蛋白不仅在肺炎支原体与宿主受体的结合中发挥粘附作用, 还在宿主细胞表面滑行的过程中起重要作用。支原体的细胞粘附性与滑行运动有关, 当一个支原体菌株失去其细胞粘附能力时, 它很容易被

宿主移除。研究发现,针对P1蛋白的抗体可特异性阻断支原体与固体表面(包括动物细胞)的结合,同时降低肺炎支原体的滑动速度^[7]。研究也表明P1蛋白在肺炎支原体诱导肥大细胞的细胞因子反应中起重要作用,肺炎支原体与肥大细胞表面唾液化残基直接接触,激活肥大细胞引起炎症损伤^[8]。

2. P30 蛋白

虽然P1被认为是主要的肺炎支原体黏附素,但它绝不是该支原体中唯一的黏附素。P30蛋白(MPN453),大小为30kDa,由274个氨基酸残基组成,位于黏附细胞器的尖端,是一种膜结合蛋白,可分为4个结构域-前导肽区、胞内段(结构域I)、跨膜区及胞外区(包括结构域II和结构域III),几乎仅在野生型细胞的末端细胞器的远端发现^[9],其羧基端朝向细胞外部,末端有富含脯氨酸的重复区域(PRRs),具有细胞黏附、滑动运动和稳定P65蛋白的功能^[10]。编码P30蛋白的基因为mpn453,位于hMW3基因的上游,并与hMW3基因共转录。研究发现,P30蛋白和P1蛋白的一些特定结构域之间存在一定程度的序列同源性,它们都代表了负责黏附的显性蛋白,在滑行机制中起着重要作用。缺失P30蛋白的突变株会丧失滑行能力,P30蛋白缺失的MP突变株与重组野生型和突变等位基因的互补实验证实了滑行缺陷与P30蛋白改变、丢失之间的相关性。在C末端截短P30或框内缺失富含Pro的基序使得MP细胞不能粘附细胞,滑行能力严重受损,并伴有细胞粘附辅助蛋白P65稳定性降低。

3. P40 蛋白、P90 蛋白

在肺炎支原体基因组中,P1粘附素(MPN141)与另外两个开放阅读框(ORF)MPN140和MPN142编码在同一个操纵子中。P40和P90是由mpn142裂解产生的粘附素,与蛋白P1形成跨膜粘附复合物,不能合成Mpn142的突变体无法将主要粘附素P1准确定位到黏附细胞器的尖端,从而失去粘附的能力。P40由454个氨基酸残基组成,是大小为48kDa的一种可溶性蛋白。P40基因的非同义突变导致尖端结构表面P1黏附复合物数量下降,证明P1蛋白插入细胞膜的过程很大程度依赖于P40。P90由764个氨基酸残基组成,大小为83kDa。其信号序列具有一部分N端跨膜结构域。P90二聚体与P1二聚体以1:2的摩尔比形成480kDa的蛋白复合物,即P1黏附复合物,使肺炎支原体能够在细

胞表面滑动。Vizarraga报道唾液酸的结合位点在P40/P90而不在P1,P1和P40/P90的N端结构域表面的遗传变异导致临床症状的变异,P40/P90也表现出高度的免疫原性,这些发现为MP感染疫苗的开发提供了新的方向。

4. P65 蛋白

P65蛋白由405个氨基酸残基组成,相对分子量为47kDa,是由mpn309基因编码的蛋白质,含有1个大的、低复杂性的APR结构域,该结构域位于N末端附近,其后是一个中央卷曲螺旋结构域和一个混合二级结构的C-末端结构域。P65蛋白氨基酸序列的特点是存在两个长度为40个氨基酸残基的重复区,分别位于第57~96氨基酸残基和第122~161氨基酸残基。P65蛋白是黏附细胞器的一个组成部分,免疫荧光显微镜和ELISA表明,P65蛋白有表面暴露区;增强型黄色荧光蛋白(EYFP)标记的P65蛋白定位于黏附细胞器。P65与P30具有密切的空间和功能关系,在对支原体培养中表达的P65和P30荧光融合蛋白的分析表明,它们几乎同时位于发育中的末端细胞器上。研究发现P65蛋白与P30蛋白在黏附复合物形成的过程中几乎同时移动,说明P65可能与P30的内部结构域相互作用,使终端按钮与膜正面紧密结合。除此之外,P65也可以通过修改附着器相对于细胞轴角度决定滑动方向。

5. P116 蛋白

P116含有1030个氨基酸残基,相对分子量为116kDa,P116蛋白在一个操纵子中编码,该操纵子由1个3093bp ORF(mpn213)和1个408bp PRF(mpn212)组成,3093bp基因的核苷酸测序显示两个ORF编码16kDa蛋白和116kDa蛋白,顺序为5'-16kDa ORF-116kDa ORF-3',被认为是一种至关重要的细胞粘附素。P116蛋白被证实是一种胰蛋白酶敏感的表面抗原。P116-C端蛋白的总体水平已被用于肺炎支原体的血清学诊断,Tabassum等人发现N-末端区域27kDa片段是P116蛋白的免疫优势区之一,利用P116和P1蛋白的重组短片段作为特异性抗原,可以消除交叉反应的风险,有助于建立特异、灵敏的MP肺炎检测。

6. HMW 蛋白

用非离子型清洁剂Triton X-100(TX)提取肺炎支原体

细胞,得到的TX不溶性部分包含该核心结构,主要由细胞骨架蛋白如HMW1、HMW2、HMW3和P65组成,这些蛋白质有助于黏附细胞器的结构,包括主要粘附蛋白P1的定位。HMW蛋白是一组高分子量复合蛋白,包括HMW1、HMW2、HMW3,是参与细胞黏附的重要辅助蛋白,分别由基因mpn447、mpn310、mpn452编码,其中mpn447和mpn452基因紧密相连,位于单个操纵子中共同表达,与mpn310基因相差160000bp。

7.TopJ

TopJ(mpn119)是一个由910个氨基酸残基组成的蛋白质,相对分子质量为100kDa,由一个J-结构域、2个富含酸性氨基酸和脯氨酸(APR)的结构域及C-端结构域组成。

参考文献:

- [1]CHAUDHRY R, GHOSH A, CHANDOLIA A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update[J/OL]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2016, 34 (1): 7-16.
- [2]MIYATA M, HAMAGUCHI T. Integrated Information and Prospects for Gliding Mechanism of the Pathogenic Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 960.
- [3]KRUNKOSKY T M, JORDAN J L, CHAMBERS E, et al. *Mycoplasma pneumoniae* host - pathogen studies in an air - liquid culture of differentiated human airway epithelial cells[J/OL]. *Microbial Pathogenesis*, 2007, 42 (2-3): 98-103.
- [4]彭凯岚, 曾焱华. 肺炎支原体P1蛋白的研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37 (4): 362-367.
- [5]WIDJAJA M, BERRY I J, JAROCKI V M, et al. Cell surface processing of the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae* identifies novel domains that bind host molecules[J/OL]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 6384.
- [6]HE J, LIU M, YE Z, et al. Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (Review)[J/OL]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14 (5): 4030-4036.
- [7]KENRI T, KAWAKITA Y, KUDO H, et al. Production and characterization of recombinant P1 adhesin essential for adhesion, gliding, and antigenic variation in the human pathogenic bacterium, *Mycoplasma pneumoniae*[J/OL]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508 (4): 1050-1055.
- [8]WIDJAJA M, BERRY I J, JAROCKI V M, et al. Cell surface processing of the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae* identifies novel domains that bind host molecules[J/OL]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 6384.
- [9]DALLO S F, LAZZELL A L, CHAVOYA A, et al. Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin.[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64 (7): 2595-2601.
- [10]WAITES K B, XIAO L, LIU Y, et al. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond[J/OL]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30 (3): 747-809.

第一作者: 侯婉莹, 女, 1998年, 延边大学附属医院, 硕士研究生;

通讯作者: 朴红梅, 女, 1969年, 主任医师、博士、研究方向: 主要从事呼吸内科系统疾病的诊治及研究。

j结构域由70-80个氨基酸残基组成,形成4个螺旋,螺旋II和螺旋III之间有一个带正电的环,内含必需组氨酸-脯氨酸-天冬氨酸(HPD)三肽。TopJ缺失可影响细胞黏附、滑行运动及细胞分裂,同时可出现P24蛋白稳态水平降低。

8.展望

近年来,重症、难治性及耐药性MPP病例数量不断上升,了解其发病机制有助于早期诊断与治疗。MP致病机制包括黏附、直接损伤、免疫逃逸等。细胞黏附是致病的先决条件,通过对各种MP黏附蛋白的研究,对其结构及功能有了一定的认识,为MP感染的检测、治疗、预防等奠定了研究基础。但现对于各黏附蛋白间的相互作用,信号传导途径,促炎机制的研究仍不全面,有待于进一步研究。